



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان
دانشکده داروسازی و علوم دارویی

پایان نامه دکترای عمومی داروسازی

عنوان:

بررسی اثر عصاره تام و فراکشن‌های هلیله سیاه (*Terminalia chebula* Retz.) بر میزان
زنده‌مانی، تشکیل ماموسفر و میزان بیان ژن $\text{HIF-1}\alpha$ در سلول‌های سرطانی رده MCF-7

توسط:

وجیهه خوش فکر

اساتید راهنما :

دکتر میترا مهربانی

دکتر مهرناز مهربانی

استاد مشاور:

دکتر فاطمه دباغ زاده

شماره پایان نامه: ۱۱۳۶

آبان ماه ۹۸



Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Pharmacy

Pharm. D Thesis

Title:

Evaluation the effect of total extract and fractions of *Terminalia chebula* Retz.
on the viability, mammosphere formation and gene expression rate of HIF-1 α
in MCF-7 cancer cells

By:

Vajihe Khoshfekar

Supervisors:

Dr. Mitra Mehrabani
Dr. Mehrnaz Mehrabani

Advisor:

Dr. Fateme Dabaghzade

خلاصه

مقدمه: سرطان به عنوان یکی از بیماری‌های مهم در قرن حاضر بوده که درمان آن مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است. امروزه درمان براساس فرآورده‌های گیاهی با اثر مهار روی رشد رده‌های سلولی سرطانی به عنوان یک روش جذاب مورد توجه قرار گرفته است. تحقیق حاضر به بررسی اثر عصاره تام و فراکسیون‌های میوه خشک هلیله سیاه (*Terminalia chebula* Retz.) بر روی زنده‌مانی رده سلولی MCF-7، میزان آپوپتوز ماموسفرهای مشتق از MCF-7 و همچنین میزان بیان ژن HIF-1 α در این سلول‌ها به عنوان یک فاکتور مهم در رگ‌زایی و رشد تومور پرداخته است.

روش کار: بدین منظور عصاره تام اتانولی از میوه خشک هلیله سیاه تهیه و سپس فراکسیون‌های مختلف آن با حلال‌های متانول ۶۰٪، پترولیوم‌تر، دی‌کلرومتان و اتیل‌استات استخراج گردید. میزان ترکیبات فنولی تام آن با روش فولین‌سیوکالتو اندازه‌گیری شد. برای بررسی اثر سایتوتوکسیک غلظت‌های مختلف عصاره گیاه و فراکسیون‌های آن بر روی سلول‌های سرطانی رده MCF-7 از روش MTT در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت استفاده شد. همچنین میزان آپوپتوز ماموسفرها بعد از زمان ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، بعد از تیمار سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های IC₅₀ عصاره تام و فراکسیون‌ها، میزان بیان پروتئین HIF-1 α با استفاده از تست وسترن بلات اندازه‌گیری شد.

نتایج: میزان عصاره تام حاصل از میوه خشک هلیله سیاه ۵۶٪ و همچنین میزان ترکیبات فنولی تام بر اساس گالیک‌اسید در این گیاه براساس mg گالیک‌اسید بر گرم عصاره خشک (Mean \pm SD) ۷۵۶/۶ \pm ۰/۱ می‌باشد. IC₅₀ بدست آمده برای عصاره تام گیاه هلیله سیاه ۱۰۰/۹ μ g/ml و فراکسیون‌های اتیل‌استات، باقی‌مانده و دی‌کلرومتان به ترتیب ۶۷/۵۰، ۱۳۴/۱ و ۷۴/۵۶ است. در تست ماموسفر به نظر می‌رسد عصاره اتیل‌استات بیشترین اثر را بر میزان آپوپتوز سلول‌ها نشان داده است. همچنین عصاره تام و فراکسیون باقی‌مانده بیشترین میزان اثر را بر کاهش بیان ژن HIF-1 α داشته‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به اثر مهارى قابل توجه هلیله سیاه بر روى رشد سلولهای MCF-7 و بیان ژن $HIF-1\alpha$ این گیاه مى‌تواند به عنوان یک منبع امیدوارکننده برای استفاده در پروتکل‌های درمانی سرطان پستان در آینده مورد توجه قرار بگیرد.

کلمات کلیدی: سمیت سلولی، هلیله سیاه، سرطان پستان، رده سلولی MCF-7، ماموسفر، استخراج

فاکتور $HIF-1\alpha$

پروتئین،

Abstract

Introduction: Cancer is one of the most important disease in the current century, that its treatment has received attentions by many researchers. Today, therapy based on plant-derived products with ability to inhibit growth of cancer cell lines is considering as an appealing approach. The present study aimed to investigate the effect of total extract and fractions of dry fruit of *Terminalia chebula* Retz. on the MCF-7 cell line viability, apoptosis of MCF-7 derived-mammospheres and HIF-1 α gene expression as an important factor in tumoral angiogenesis and growth.

Methods: For this purpose, total extract was prepared from dry fruit of *T. chebula* and then its fractions were extracted by methanol 60%, petroleum ether, dichloromethane and ethyl acetate, respectively. The amount of total phenolic compounds were measured using Folin-ciocalteo method. For evaluating of the cytotoxic effect of different concentrations of *T. Chebula*-derived total extract and its fractions on MCF-7 cell lines, MTT assay was used after 24 and 48 hours. Furthermore, apoptosis rate of MCF-7- derived mammospheres was assessed after 48 hour. Eventually, after treatment of MCF-7 cells with total extract and fractions at IC₅₀ concentration, HIF-1 α protein expression was determined by Western blot assay.

Results: Total extract of *T. chebula* was 56%. Also the amount of total phenolic compounds based on Gallic acid was 756.6 \pm 0.1 (Mean \pm SD) mg Gallic acid per g dry fruit. IC₅₀ obtained for total extract was 100.9 μ g/ml and for ethylacetate, residual and dichloromethane fractions were 67.50, 134.1 and 74.56 μ g/ml, respectively. The mammosphere test was revealed that ethyleacetate fraction had higher apoptotic rate when compared to other fractions. Furthermore, total extract and residual fraction had a significant negative effect on HIF-1 α protein expression in MCF-7.

Conclusion: Regarding the significant inhibitory effect of *T. chebula* on the growth of MCF-7 cell line and expression rate of HIF-1 α at protein level, it might be considered a promising natural source for application in the future breast cancer therapeutic protocol.

Keywords: Cytotoxicity, *Terminalia chebula* Retz. , Breast Cancer, MCF-7 Cell Lines, Mammosphere, Protein Extraction, HIF-1 α Factor



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده داروسازی

پایان نامه خانم وجیهه خوش فکر دانشجوی داروسازی ورودی ۹۲ به شماره: ۱۱۳۶

تحت عنوان:

"بررسی اثر عصاره تام و فراکشن های هلیدسیاه (*Terminalia chebula* Retz.) بر میزان زنده ماندن،

تشکیل ماموسفر و میزان بیان ژن β -tubulin در سلولهای سرطانی رده MCF-7"

اساتید راهنما:

۱- دکتر میترا مهربانی

۲- دکتر مهرناز مهربانی

اساتید مشاور:

۱- دکتر فاطمه دباغ زاده

هیئت محترم داوران به ترتیب حروف الفبا:

۱- دکتر فریبا شریفی فر

۲- دکتر صالحه صبوری

در تاریخ ۹۸/۰۸/۱۳ مورد ارزیابی قرار گرفت و با نمره (با عدد) ۱۹
(با حروف) نوزدهم به تصویب رسید.

دکتر مصطفی پورنامداری

رئیس اداره پایان نامه

دکتر باقر امیرحیدری

رئیس دانشکده

